

Головченко Виктория Владимировна

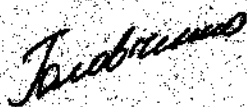
**Строение лемнана - пектинового полисахарида
из ряски малой *Lemna minor L.***

02.00.10 - биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



Работа выполнена в Институте физиологии Коми научного центра Уральского
отделения Российской академии наук

Научные руководители:

академик РАН

Овдов Ю.С.

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Овдова Р.Г.

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
профессор
Усов А.И.

доктор химических наук,
профессор
Балтина Л.А.

Ведущая организация:

Институт химии Коми НЦ УрО РАН
г. Сыктывкар

Защита состоится 28 марта 2003 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета
Д.002.004.01 при Институте органической химии УНЦ РАН, по адресу: 450054,
Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке УНЦ РАН.

Автореферат разослан "26" февраля 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук



Ф.А. Валеев

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Растительные полисахариды являются важными компонентами питания человека. Но, несмотря на то что многие из них: целлюлоза, гемицеллюлозы и пектины, - не утилизируются организмом, они необходимы для нормального функционирования как пищеварительной системы, так и всего организма в целом. Широким спектром физиологической активности обладают пектиновые полисахариды, включая гастропротективное, иммуномодулирующее, антиоксидантное, радиопротекторное действие. Выяснение влияния структурных элементов макромолекул пектинов на их биологические функции и физиологическую активность является одной из принципиальных задач современной биоорганической химии.

Ряска малая, уникальное цветковое пресноводное растение, представляет собой чрезвычайно ценный объект не только для морфогенетических, но и для физиологических и биохимических исследований. Лекарственная ценность семейства рясковых обуславливает интерес к их химическому составу. Ряска в виде салатов, отваров и настоев издавна использовалась в народной медицине как жаропонижающее, противовоспалительное, желчегонное средство. Предварительные исследования показали, что в состав пектина данного растения входит значительное количество необычного разветвленного моносахарида апиозы. Апиоза как структурный элемент макромолекул пектинов в больших количествах встречается редко. Впервые она была обнаружена в составе апиина, гликозида петрушки *Apium petroselinum*, и лишь позднее в составе зостерана, пектина из морских трав сем. *Zosteraceae*. Структурное исследование пектина ряски, названного нами лемнаном, несомненно, является актуальным и представляет значительный принципиальный и прикладной интерес, особенно в свете выяснения взаимосвязи химической структуры и биологической активности пектиновых веществ.

Диссертационная работа выполнялась с 1999 по 2003 гг. как раздел комплексной темы Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН: "Структурно-химическая характеристика, биотехнология и физиологическая активность углеводсодержащих соединений природных объектов европейского Севера России. Биотехнология карбогидраз - ферментов углеводного обмена" (№ 01.9.60 001 209) при поддержке Научного Совета "Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья" (грант ХТРС №№ 8.1.13, 8.1.4), Министерства промышленности, науки и технологий РФ (грант № 02-4208), РФФИ (фанты №№ 00-04-48063а, 01-04-96437а, 01-04-06032мас).

Цель работы. Выделить лемнан, пектин из ряски малой *Lemna minor* L., и установить строение его макромолекулы.

Научная новизна. Впервые получена обширная информация по спектроскопии ЯМР апиозы и апиобиозы.

Установлено, что в состав лемнана, наряду с блоком галактуронана и апиогалактуронана, входит разветвленный фрагмент гетерогликаногалактуронана.

Впервые методом ЯМР-спектроскопии установлено наличие ковалентной связи между главной углеводной цепью, состоящей из α -1,4-связанных остатков галактуроновой кислоты, и боковыми цепями, образованными единичными и β -1,5-связанными остатками апиозы.

Практическая значимость. Разработанный модифицированный способ получения лемнана из ряски может быть использован для препаративного выделения других пектиновых полисахаридов в виде очищенных биопрепаратов, пригодных для дальнейших многоплановых экспериментальных исследований.

Полученные данные по спектроскопии ЯМР лемнана, его фрагментов, а также апиозы и апиобиозы могут быть использованы для выявления и структурного исследования пектиновых веществ, содержащих остатки апиозы, в том числе в рамногалактуронане II (RG-II), пектиновом полисахариде первичных клеточных стенок суспензионных культур.

Разработанный метод получения апиозы в индивидуальном виде позволяет наработать этот уникальный моносахарид в препаративных количествах в качестве ценного биохимического препарата для широкого круга химических, биологических и медицинских исследований.

Данные по химической структуре лемнана в сочетании с уже имеющимися сведениями о его иммуномодуляторном и гастропротективном действии открывают перспективу применения лемнана в составе лечебных пищевых добавок и других лекарственных средств.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Всероссийской конференции "Химия и технология растительных веществ" (Сыктывкар, 2000), 11-м Европейском симпозиуме по углеводам (Лиссабон, Португалия, 2001), 7-й Европейской международной школе по углеводам (Вагенинген, Нидерланды, 2002), II Всероссийской конференции "Химия и технология растительных веществ" (Казань, 2002), на III-м съезде Всероссийского биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе две статьи и два патента Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная

Работа изложена на 125 часть), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 125 страниц, содержит 20 рисунков.

Основное содержание работы

1. Выделение и общая характеристика лемнана, пектина ряски малой *Lemna minor* L.

Нами из ряски малой, широко распространенной в Республике Коми, выделен пектин, названный лемнаном и обладающий иммуномодулирующим и гастропротективным действием.

При выборе оптимального варианта выделения лемнана сравнивали результаты экстракции воздушно-сухой, свежесобранной и замороженной ряски. В результате было установлено, что образцы лемнана, выделенные из воздушно-сухого и свежесобранного сырья, практически идентичны, но во втором случае выход лемнана был существенно выше. Образец, выделенный из замороженного сырья, отличается от первых двух значительным содержанием ксиллозы, что может свидетельствовать о разрушении клеточной стенки растения в процессе замораживания-оттаивания и об освобождении гемицеллюлоз. Для дальнейших исследований в качестве сырья для выделения лемнана использовали свежесобранную ряску.

Для экстракции лемнана за основу был взят метод выделения зостерана - пектинового полисахарида из морских трав семейства *Zosteraceae*. Данный выбор связан с тем, что для экстракции зостерана используется свежесобранное растительное сырьё, в самом методе выделения отсутствует стадия экстракции водой и водными растворами кислот, а для извлечения зостерана применяется водный раствор оксалата аммония.

В связи с отсутствием в ряске водорастворимых полисахаридов использовали водный раствор формальдегида для дезактивации ферментов, удаления части низкомолекулярных веществ и связывания полифенольных соединений; разрушение протопектина проводили подкисленной водой (рН 4.0), обработку продолжали до прекращения изменения рН раствора; экстракцию лемнана проводили водным раствором оксалата аммония (рис. 1). Далее экстракт обрабатывали двумя способами: в первом очистку предварительно сконцентрированного экстракта осуществляли осаждением этиловым спиртом и диализом, во втором для этих же целей использовали волоконный аппарат для ультрафильтрации.

При сравнении образцов лемнана, выделенных по приведенной на рис. 1 схеме, а также с применением ультрафильтрации, было найдено, что аналитические характеристики образцов, полученных обоими методами, близки друг другу (табл. 1) и, следовательно, оба метода являются взаимозаменяемыми. Однако следует указать, что при применении ультрафильтрации отмечается быстрое концентрирование и очистка водных растворов лемнана, что приводит к заметной экономии времени выделения очищенного лемнана и позволяет опустить стадию осаждения этиловым спиртом.

В результате предварительного исследования образцов лемнана, выделенных из ряски, собранной в период с июня по октябрь, показано, что к октябрю в лемнана повышается содержание галактурановой кислоты, растет вязкость водных растворов, количество моносахаридных остатков остается практически неизменным (табл. 1). По всей видимости, именно к этому месяцу в растении полностью завершается биосинтез пектина.

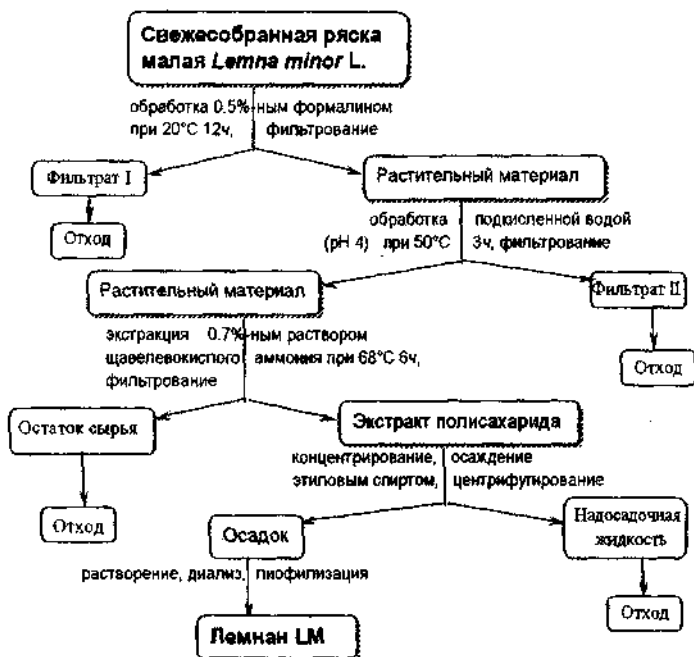


Рис. 1. Схема выделения пектина из ряски малой *Lemna minor* L.

Гомогенность выделенного лемнана, которая является чрезвычайно важной характеристикой для дальнейшего структурного исследования, определяли методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (ОН-форма) при элюировании водными растворами хлорида натрия возрастающей концентрации (0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 и 0.5 M NaCl). Найдено, что лемнан независимо от способа выделения элюируется 0.3 M NaCl (табл. 1). Это указывает на гомогенность выделенных полисахаридов по плотности заряда.

Установлено, что лемнан содержит лишь незначительные количества белковых примесей (~2%) и золы (~1.2%).

2. Определение моносахаридного состава лемнана

Идентификацию галактурановой кислоты осуществляли с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде ацетатов метоксилированных

Таблица 1

Выход, удельная вязкость, молекулярная масса и аналитические данные лемнана в зависимости от времени сбора ряски

| Время сбора ряски | Выход, % | [η], дл/г | \bar{M} кДа | Содержание, % ² | | | | | | |
|-----------------------|----------|-----------|---------------|----------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| | | | | белка | GalA | Api | Rha | Ara | Xyl | Gal |
| июнь | 12.5 | 0.13 | 18.6 | 1.0 | 35 | 10.9 | 2.2 | 3.4 | 4.0 | 5.7 |
| июль | 13.5 | 0.16 | 24.3 | 1.5 | 43 | 8.9 | 1.9 | 0.6 | 1.3 | 2.2 |
| август | 10.0 | 0.21 | 31.5 | 2.0 | 51 | 19.1 | 2.5 | 4.1 | 4.0 | 5.0 |
| сентябрь | 9.4 | 0.26 | 41.7 | 2.0 | 51 | 19.4 | 2.2 | 3.4 | 4.1 | 4.3 |
| октябрь | 8.4 | 0.32 | 53.4 | сл | 64 | 19.6 | 3.2 | 3.9 | 3.7 | 4.9 |
| октябрь* | 8.3 | н.о. | н.о. | сл | 62 | 20.5 | 2.9 | 4.1 | 3.5 | 3.8 |
| октябрь* | 7.5 | н.о. | н.о. | сл | 65 | 24.7 | 2.9 | 1.8 | 1.5 | 3.2 |
| октябрь* ¹ | 7.9 | н.о. | н.о. | сл | 60 | 25.2 | 2.2 | 2.7 | 2.1 | 2.9 |

*- полисахарид, полученный методом ультрафильтрации на полых волокнах;

- очищенный методом ионообменной хроматографии полисахарид;

%¹ - выход полисахаридных фракций от высушенного растительного сырья;

%² - весовые проценты, н.о. - не определяли;

[η] - удельная вязкость в децилитрах на грамм.

по карбоксилу метилгликуронозидов сравнением с заведомыми образцами. Для определения количественного содержания галактуроновой кислоты использовали спектрофотометрический метод.

Качественный моносахаридный состав определяли методом бумажной хроматографии (БХ) после предварительного гидролиза лемнана 2М трифторуксусной кислотой (TFA), количественный - методом ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов. В результате установлено, что в лемнана главными компонентами углеводной цепи являются апиоза и галактуроновая кислота. Рамноза, арабиноза, ксилоза, галактоза выступают в качестве минорных компонентов (табл. 1).

ГЖХ приводит к четкому разделению ацетатов апиита на два соединения с относительными временами удерживания (Rt), равными 0.63 и 0.75 по отношению к внутреннему стандарту - мио-инозиту (рис.2а), которые представляют собой 1,2,4,5-тетра-О-ацетат и перацетат апиита, что подтверждается соответствующими масс-спектрами (рис.2б). В масс-спектрах (ионная ловушка) обоих соединений имеется пик m/z 303, который является продуктом превращения протонированного молекулярного иона, $[m+H-NOAc]^+$ и $[m+H-H_2O]^+$ соответственно.

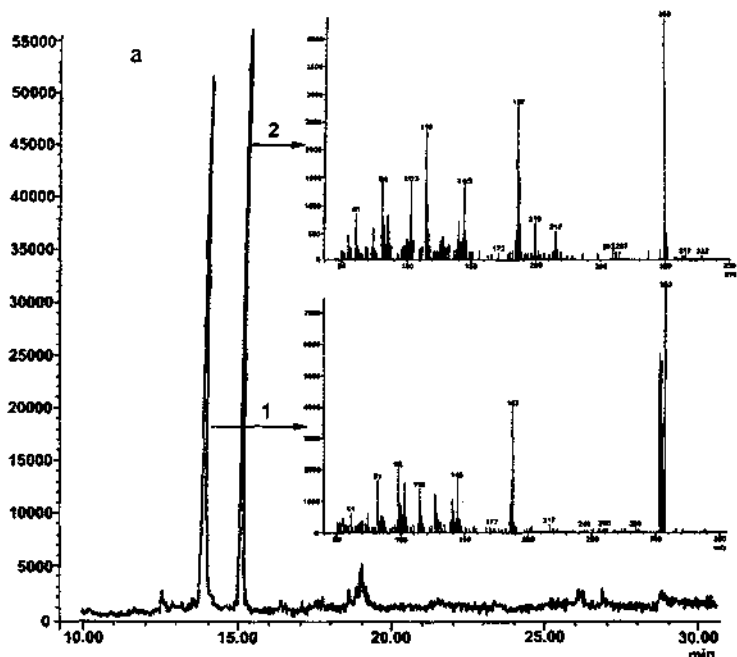


Рис. 2. Хромато-масс-спектрометрия апиозы в виде соответствующих ацетатов апиита.

а - ГЖХ ацетатов апиита; б -масс-спектрометрия ацетатов апиита;
1- 1,2,4,5-тетра-О-ацетат апиита; 2 - перацетат апиита.

Для определения конфигурации моносахаридов, входящих в состав лемнана, провели полный кислотный гидролиз 2М ТФА. Из полученного гидролизата были выделены индивидуальные моносахариды с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при использовании смеси ацетонитрил: вода (84:16, v/v) в качестве элюента.

Все выделенные в индивидуальном состоянии моносахариды имеют положительное удельное вращение, что указывает на принадлежность арабинофуранозы и рамнопиранозы к L-, а галактопиранозы и ксилозы - к D-ряду. Хотя моно-О-метил-ксилозу и апиозу разделить не удалось, однако положительное удельное вращение полученной смеси указывает на то, что скорее всего в состав лемнана входит производное D-ксилозы, тем более, что L-ксилоза практически не встречается в растительных полисахаридах.

При мягком кислотном гидролизе 0.01 М ТФА в течение 3 ч при 80°C (рис.3) от молекулы лемнана отщепляются углеводные цепи, состоящие только из остатков D-апиозы. В результате образуются фрагменты LMН-3 и LMН-4 (табл. 2).

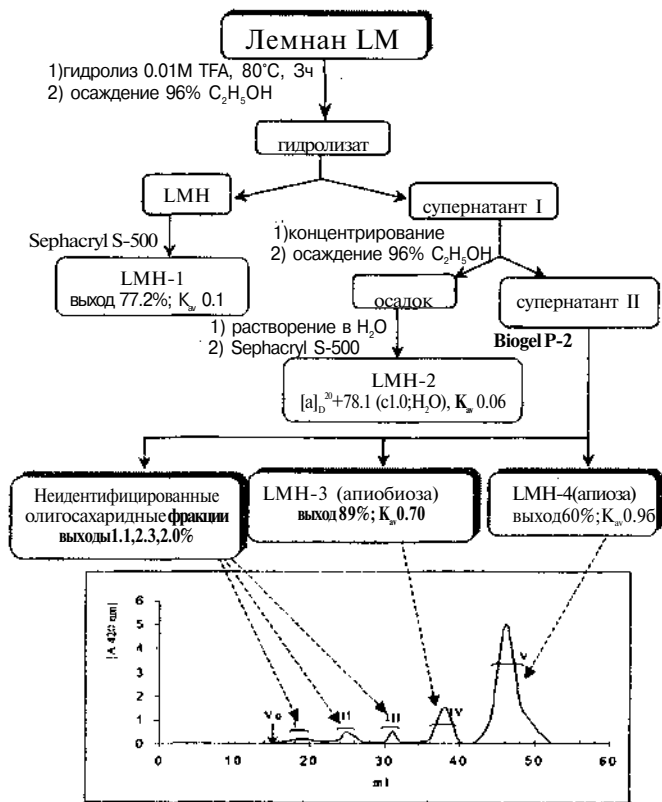


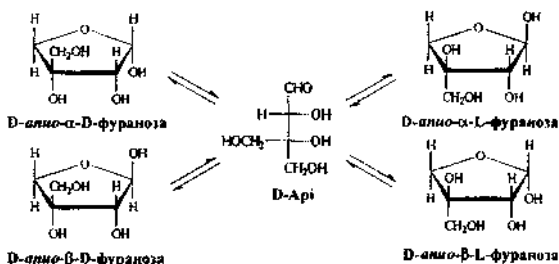
Рис. 3 Схема частичного кислотного гидролиза лемнана 0.01 М TFA

Таблица 2

Моносахаридный состав фрагментов лемнана

| Фрагменты лемнана | Выход, % от лемнана | Содержание моносахаридных остатков, % | | | | | | |
|-------------------|---------------------|---------------------------------------|------|------|------|-----|------|-----------|
| | | Gal A | Api | Ara | Gal | Rha | Xyl | Xyl-2-OMe |
| LM-1 | 54.4 | 99.1 | - | - | - | - | - | - |
| LM-2 | 16.4 | 75.6 | 18.4 | - | - | - | - | - |
| LMH | 78.9 | 72.2 | 16.7 | 3.7 | 4.8 | 2.0 | 5.4 | сл |
| LMH-1 | 60.9 | 70.7 | 12.2 | 3.0 | 4.9 | 1.2 | 5.2 | сл |
| LMH-2 | 0.7 | 24.7 | 18.2 | 15.0 | 22.7 | 2.7 | 4.1 | 0.7 |
| LMH-3 | 1.6 | - | 84.2 | 3.6 | 3.0 | 3.1 | - | сл |
| LMH-4 | 10.8 | - | 97.0 | - | - | - | - | сл |
| LMHR-1 | 2.2 | 84.1 | 1.3 | 3.3 | 6.4 | сл | 3.1 | сл |
| LMHR-2 | 3.1 | 60.8 | 0.9 | 2.4 | 12.9 | 1.0 | 11.8 | 0.4 |
| LMHS | 29.0 | 31.2 | 1.0 | 14.4 | 19.5 | 1.5 | 19.3 | сл |

С помощью спектроскопии ЯМР показано, что в состав фракции LMН-3, наряду с апиобиозой, в малых количествах входит апиоза, а LMН-4 представляет собой апиозу с минорными количествами апиобиозы. Водный раствор апиозы, выделенной из лемнана, представляет собой таутомерную смесь *D*-апио-*D*- и *D*-апио-*L*-фуранозы, причем оба таутомера присутствуют в виде α - и β -аномеров:



Протонные и углеродные спектры ЯМР фракций LMН-3 и LMН-4 были расшифрованы при совместном анализе двумерных спектров COSY, NOESY, HSQC и HMBC. Основным признаком α -конфигурации остатка *D*-апиозы является положение сигналов C-1 и C-2 в углеродном спектре в более сильном поле по сравнению с сигналами для остатков с β -конфигурацией. Признаком принадлежности к *D*-ряду незамещенного остатка апиофуранозы в углеводной цепи служит совпадение химических сдвигов двух протонов при C-5, в то время как в *L*-ряду их химические сдвиги существенно различаются. Для удобства изложения C3'-атом апиозы обозначен нами, как C5-атом. Определению принадлежности трех изолированных протонных спиновых систем (протоны H-1 и H-2, два протона при C-4 и два протона при C-5) к одному и тому же остатку способствуют (помимо упомянутого выше различия в интенсивности сигналов) слабые корреляционные пики в спектре NOESY H-5/H-4 для таутомеров апиофуранозы. Отнесение в протонном спектре позволило найти положение сигналов протонированных атомов углерода в каждом из остатков *D*-апиозы (рис. 4).

Положение четвертичного атома углерода (C-3) для каждого из остатков *D*-апиозы найдено по наличию корреляционных пиков C-3 и некоторых протонов рассматриваемого остатка в спектре HMBC (рис.5). В дисахаридных остатках 1,5-связь следует из наличия корреляционного пика H-1 гликозилирующего остатка β -D-Api (A¹) и C-5 гликозилированного остатка A как с α -D-, так и с β -D-конфигурацией. Наличие корреляционного пика H-1 (A¹)/H-5(A) в спектре NOESY также подтверждает 1,5-связь в апиобиозе (LMН-3). Все остальные результаты анализа спектров сведены в табл.3 и 4, где приведены химические сдвиги всех атомов апиозы в четырех таутомерных формах.

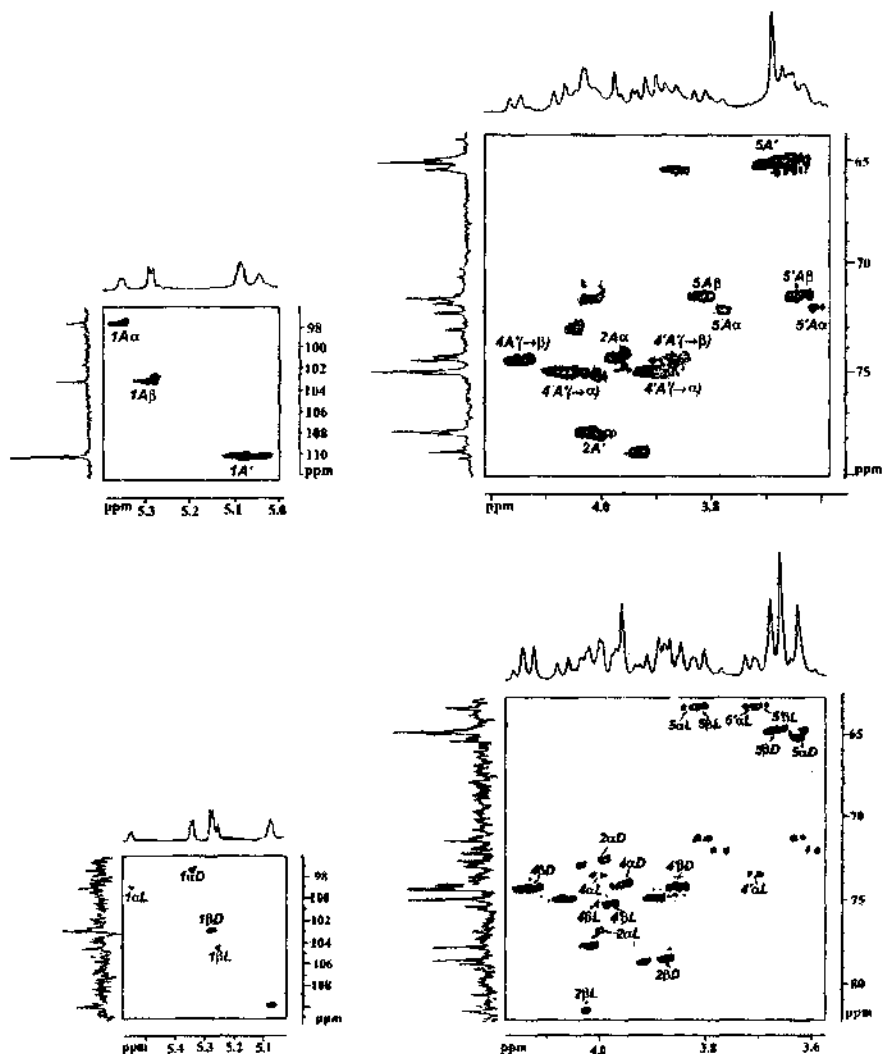


Рис.4. Спектры HSQC фракции: LMN-3 (а) и LMN-4 (б). На (а) рисунке приведены обозначения только при корреляционных пиках, относящихся к дисахаридным остаткам, на (б) - только к моносахаридным остаткам. Арабские цифры относятся к номерам протонов или атомов углерода. Гликозилирующий остаток в дисахариде обозначен, как A', гликозилированный, как A α или A β в зависимости от аномерной конфигурации.

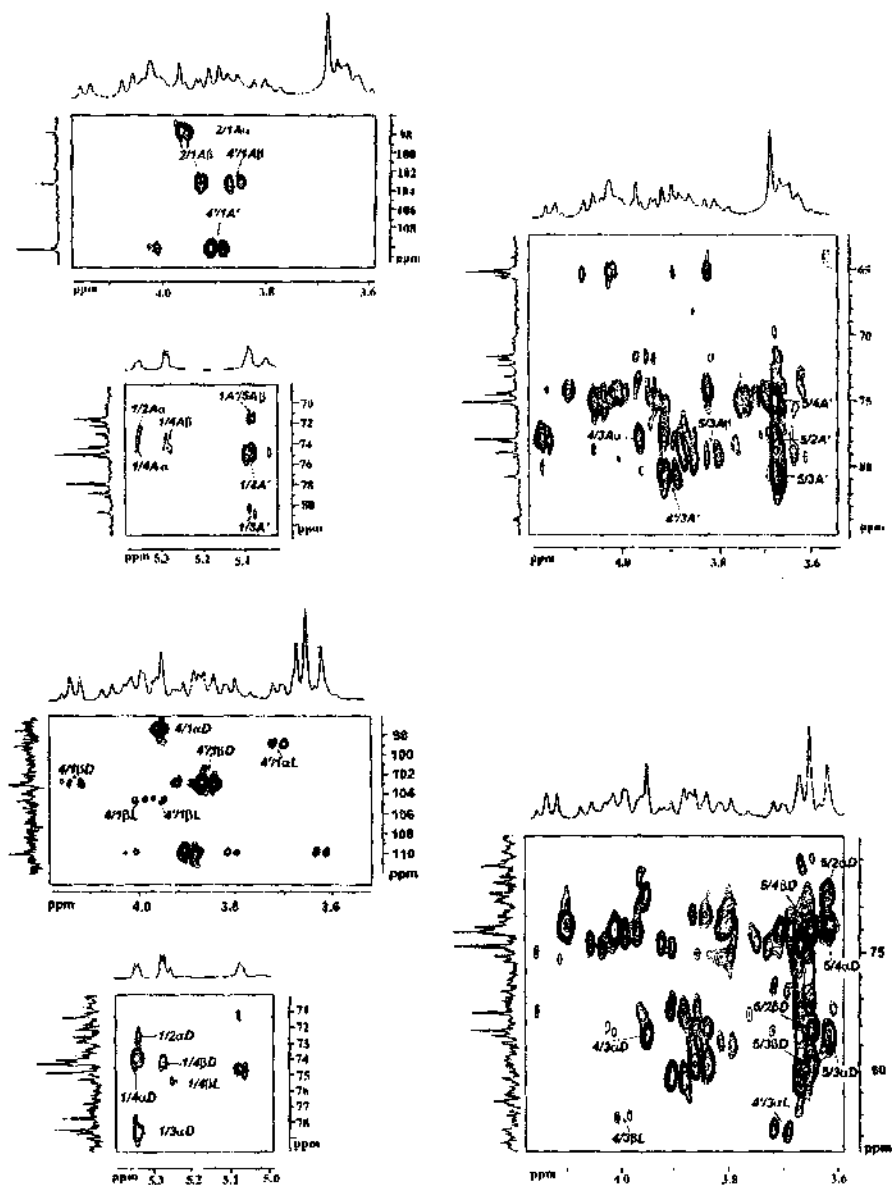


Рис.5. Спектры НМВС фракции: LMN-3 (а) и LMN-4 (б). Арабские цифры до косой разделительной черты относятся к номерам протонов в остатках, за ней – к номерам атомов углерода, с которыми наблюдается корреляция. Остальные детали, как в подписи к рис.4.

Таблица 3

Химические сдвиги ^1H и КССВ $J_{1,2}$, $J_{4,4'}$ и $J_{5,5'}$ (в скобках) в остатках апиозы

| Остаток | Химические сдвиги, 5 м.д. (ацетон 2.225 м.д.) | | | | | |
|---------------------|---|------------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------------|
| | H-1 | H-2 | H-4 | H-4' | H-5 | H-5' |
| β -D-Api-1 | 5.07 (3.7) ^{a)} 5.06(3.7) ^{b)} | 4.01 | 4.05(10.3) | 3.89 | 3.67 | 3.67 |
| β -5-D-Api-OH | α -D | 5.34(4.9) 5.27(4.7) | 4.03 3.91 | 3.96 4.14(10.3) | 3.96 3.85 | 3.77(10.1) 3.80(10.4) |
| | α -Api-OH D | 5.33(5.0) | 3.99 | 3.95 | 3.95 | 3.61 |
| β -Api-OH D | | 5.27(4.4) | 3.87 | 4.12(10.2) | 3.85 | 3.65 |
| α -Api-OH L | | 5.55(3.8) | 3.99 | 4.00(10.5) | 3.70 | 3.83(10.1) |
| β -Api-OH L | | 5.25(<2) | 4.02 | 4.02 | 3.97 | 3.80(8.0) |

^{a)} H-1 остатка, гликозилирующего α -Api;^{b)} H-1 остатка, гликозилирующего P-Api.

Таблица 4

Химические сдвиги ^{13}C в остатках апиозы

| Остаток | Химические сдвиги, 5 м.д. (ацетон 31.45 м.д.) | | | | |
|---------------------|---|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 |
| β -D-Api-1 | 109.9 | 77.6 | 80.5 | 74.8 | 64.8 |
| β -5-D-Api-OH | α -D | 97.4 102.9 | 72.8 78.6 | 77.9 78.9 | 74.05 74.2 |
| | α -Api-OH D | 97.5 | 72.6 | 78.7 | 74.0 |
| β -Api-OH D | | 103.0 | 78.5 | 80.1 | 74.02 |
| α -Api-OH L | | 99.0 | 76.8 | 82.8 | 73.5 |
| β -Api-OH L | | 104.6 | 81.6 | 82.2 | 75.25 |

Хорошее разрешение сигналов атомов углерода для всех четырех форм в углеродном спектре позволяет определить примерное соотношение всех форм апиофуранозы в таутомерном равновесии как α -D: α -L: β -D: β -L=3:1:5:2.

Таким образом, было установлено, что в состав углеводных цепей лемнана входят остатки нейтральных моносахаридов: D-апиофуранозы, L-арабинофуранозы, L-рамнопиранозы, D-ксилопиранозы, моно-O-метил-D-ксилопиранозы.

3. Галактуронан - главная углеводная цепь лемнана

Частичный гидролиз лемнана 0.1M TFA приводит к образованию галактуронана LM-1 (табл.2). Высокое положительное удельное вращение галактуронана, $[\alpha]^{20}_D +259^\circ$ (с 0.1, в водн. аммиаке), указывает на D-конфигурацию остатков галактуроновой кислоты. Устойчивость к кислотному

гидролизу галактуронана свидетельствует о пиранозной форме остатков галактуроновой кислоты. Характерной особенностью полученного галактуронана LM-1 является низкая степень метоксилирования карбоксильных групп остатков D-галактуроновой кислоты (4.1%).

Спектр ^{13}C -ЯМР галактуронана LM-1 (рис.6) указывает на присутствие в углеводной цепи фрагмента 4- α -D-GalA-1, который дает сигнал аномерного углеродного атома при 100.6 м.д. Положение сигналов остальных атомов остатков D-галактуроновой кислоты соответствует таковому для ^{13}C -ЯМР-спектров заведомого α -1,4-D-галактопиранозилуронана. Кроме того, спектр ^{13}C -ЯМР галактуронана LM-1 (рис.6) указывает на преимущественное наличие остатков галактуроновой кислоты, лишенных метоксильных групп, поскольку сигнал C6-атома остатков галактуроновой кислоты LM-1 находится при 174,7 м.д. и свидетельствует об отсутствии метоксильных групп. Известно, что C6-атом метоксилированной галактуроновой кислоты дает сигнал при 172,4 м.д. в дополнение к сигналу углерода метоксильной группы при 54.1 м.д.

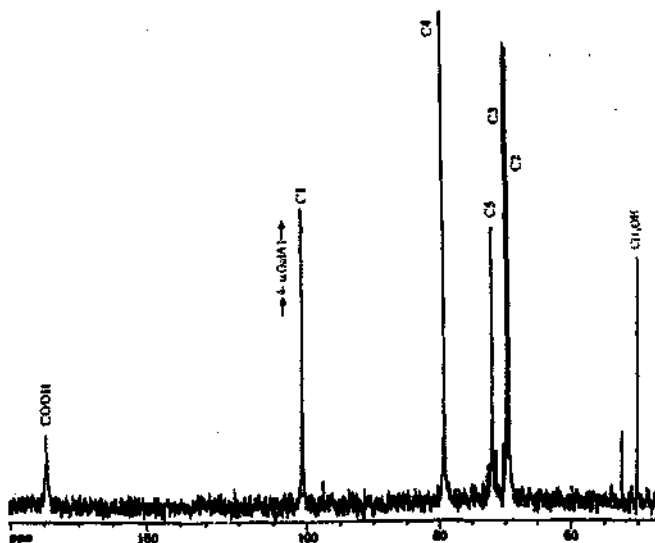


Рис.6. Спектр ^{13}C -ЯМР α -1,4-D-галактуронана лемнана

Следовательно, подобно многим пектиновым полисахаридам, лемнан содержит в составе углеводной цепи значительные участки α -1,4-D-галактуронана, что подтверждает его принадлежность к классу пектиновых полисахаридов.

4. Апиогалактуронан — основной фрагмент разветвленной области лемнана

Ферментативная обработка лемнана α -1,4-О-галактопиранозилуранозой приводит к существенной деструкции его углеводной цепи, к выделению свободной галактуроновой кислоты и к образованию апиогалактуронана (фрагмент LM-2), выход 15.4%, $[\alpha]_D^{20} +105^\circ$ (с 0.1; H₂O), устойчивого к действию фермента (табл.2).

Спектры ЯМР фрагмента LM-2 (рис.7) были расшифрованы (табл.5 и 6) при совместном анализе двумерных корреляционных спектров COSY, TOCSY, ROESY и HSQC.

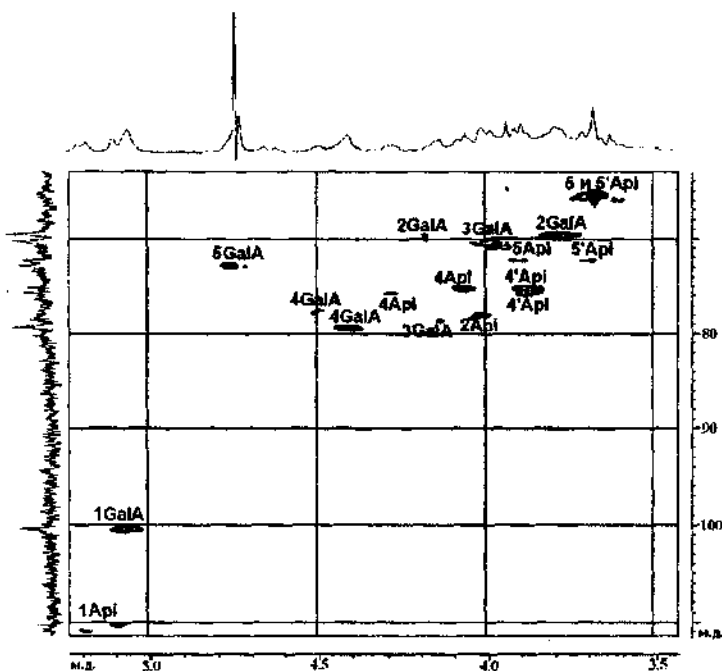


Рис.7. Гетероядерный спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC апиогалактуронана LM-2.

Показано, что наиболее интенсивные (в то же время наиболее уширенные) сигналы принадлежат α -1,4-связанным остаткам D-галактопиранозилурановой кислоты. В спектре ROESY видны слабые корреляционные пики для протонов H-1 апиозы и протонов при 4.14, 4.06, 3.90 и 3.69 м.д. В спектре HSQC этим протонам соответствует атомы углерода C-3, C-4 (78.6 и 77.4 м.д.) минорных остатков галактуроновой кислоты и C-5 (71.3 м.д.) большей части

Таблица 5

Химические сдвиги сигналов протонов, принадлежащих остаткам галактурановой кислоты и апиозы, в спектре¹ Н-ЯМР апиогалактуронана

| Остаток | Химические сдвиги, 5 м.д. (ацетон 2.225 м.д.) | | | | | |
|--------------------|---|------|------|------|------|------|
| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | |
| 4)-α-GalpA-(1 | 5.05 | 3.78 | 3.99 | 4.40 | 4.75 | |
| 4)-α-GalpA-(1 3 | 5.05 | 4.17 | 4.14 | 4.50 | 4.75 | |
| | H1 | H2 | H4 | H4' | H5 | H5' |
| 5)-β-Api-(1 | 5.10;5.20 ^{a)} | 4.01 | 4.29 | 3.88 | 3.90 | 3.69 |
| β-Api-(1 | 5.10;5.20 ^{a)} | 4.01 | 4.06 | 3.89 | 3.68 | 3.68 |

^{a)} Первое значение - для остатка, замещающего β-Api по C5,
второе - для остатка, замещающего α-GalpA по C3.

Таблица 6

Химические сдвиги сигналов атомов углерода остатков галактурановой кислоты и апиозы в спектре¹³С-ЯМР апиогалактуронана

| Остаток | Химические сдвиги, 5 м.д. (ацетон 31.45 м.д.) | | | | | |
|--------------------|---|------|------|------|------|-------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
| 4)-α-GalpA-(1 | 100.2 | 69.5 | 70.3 | 79.2 | 72.8 | 176.7 |
| 4)-α-GalpA-(1 3 | 100.2 | 69.5 | 78.6 | 77.4 | 72.8 | 176.7 |
| 5)-β-Api-(1 | 110.1;110.7 ^{a)} | 78.0 | 81.3 | 75.8 | 71.3 | |
| β-Api-(1 | 110.1; 110.7 ^{a)} | 78.0 | 80.2 | 75.2 | 65.3 | |

^{a)} Первое значение - для остатка, замещающего β-Api по C5,
второе - для остатка, замещающего α-GalpA по C3.

остатков апиозы. Это позволяет предположить, что часть остатков галактурановой кислоты замещена по C-3 остатками апиозы или апиоолигосахаридами, о чем свидетельствует смещение в спектре ЯМР сигналов C-3 галактурановой кислоты в слабое поле (78.6 м.д. по сравнению с таковыми при 70.3 м.д. в незамещенном остатке). О наличии коротких цепей из остатков апиозы свидетельствует двойной набор сигналов H-1, H-4,4' и H-5,5' в протонном спектре и C-1, C-3, C-4 и C-5 в углеродном спектре (табл. 5 и 6). Тип 1,5-замещения в таких цепях следует из локализации в слабом поле химического сдвига C-1 замещающего остатка апиозы (110.1 м.д.) и C-5 замещенных остатков (71.3 м.д.).

Таким образом, апиогалактуронан LM-2 представляет собой разветвленный полисахарид, главная углеводная цепь которого состоит из

остатков α -1,4-связанной D-галактопиранозилурановой кислоты, а боковые цепи образованы единичными и 1,5-связанными остатками D-апиофуранозы, присоединенными в 3-положение остатков GalpA главной цепи.

5. Фрагменты гетерогликаногалактуронана - минорные участки разветвленной области лемнана

Из супернатанта, полученного при осаждении гидролизата лемнана 0.01M TFA (3 ч при 80°C) этиловым спиртом, в качестве минорного компонента была выделена фракция LMN-2; из осадка - фракция LMN, которая в процессе гельхроматографии на сефакриле S-500 дает лишь один основной пик (рис.3) фрагмента LMN-1, выход 77.2% от масса навески, нанесенной на колонку (60.9% от массы лемнана), $\kappa_w = 0.10$. Этот результат указывает на относительную гомогенность фракций LMN по молекулярной массе.

LMN-2 представляет собой фрагмент гетерогликаногалактуронана, который отличается низким содержанием галактуроновой кислоты. Главными нейтральными моносахаридами фрагмента LMN-2 являются апиоза, арабиноза, галактоза и ксилоза (табл.2).

Анализ двумерных спектров COSY, TOCSY, ROESY и HSQC показал присутствие во фрагменте LMN-2 остатков терминальной арабинофуранозы, замещающей остатки соседней арабинофуранозы в 3- и 5-положения, и 1,5-связанных остатков α -арабинофуранозы (рис.8, табл.7). Кроме того, показано наличие в данном фрагменте β -1,5-связи между остатками D-апиозы. Корреляционный пик в гомоядерном спектре ROESY в области 5.12/3.68 м.д. подтверждает наличие коротких цепей из остатков апиозы, связанных между собой 1,5-связью.

Во фрагменте LMN-2 идентифицированы терминальные, β -1,3- и β -1,4-связанные остатки галактопиранозы, на данные типы связей указывают химические сдвиги C3- и C4- атомов галактопиранозы в области 83.2 м.д. и 78.1 м.д. соответственно. Резонанс C2-атома ксидопиранозы в области 83.3 м.д. свидетельствует о возможном наличии 2-O-метильной группы у 1,4-связанных остатков ксидопиранозы (табл.7, рис.8), что соответствует присутствию 2-O-метил-ксидопиранозы в углеводной цепи лемнана.

В результате дальнейшего кислотного гидролиза фрагмента LMN 0.05 M TEA получен фрагмент LMHR, гельхроматография которого на сефакриле S-500 приводит к образованию двух фрагментов: LMHR-1 и LMHR-2 (рис.9).

Основными составляющими компонентами углеводной цепи фрагмента LMHR-1 являются остатки D-галактуроновой кислоты (84.1%). В составе полисахаридного фрагмента LMHR-2, наряду с галактуроновой кислотой (60.8%), идентифицированы галактоза (12.9%) и ксилоза (11.8%), содержание которых в исходном лемнана незначительно.

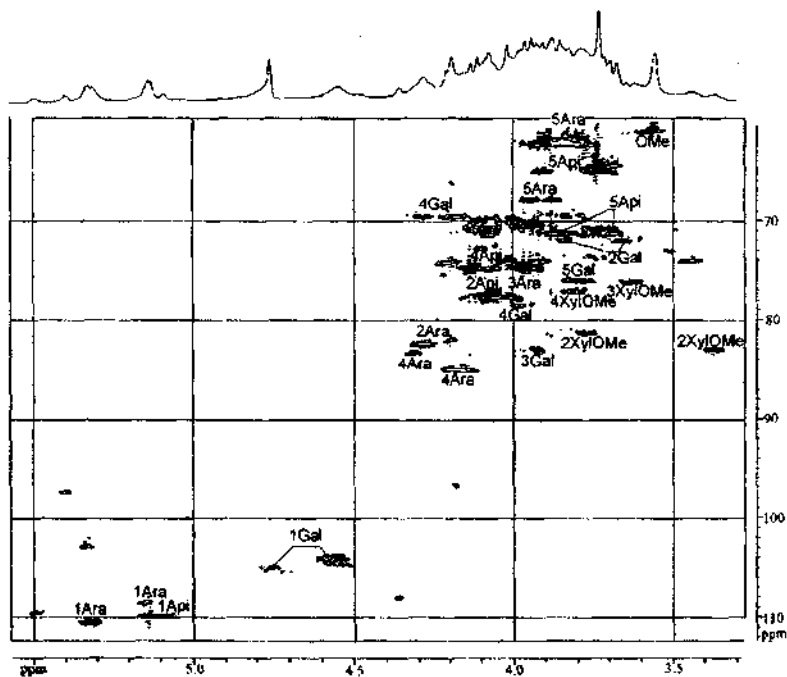


Рис.8. Гетероядерный спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC фрагмента LMH-2.

Таблица 7

**Химические сдвиги сигналов атомов углерода и водорода
в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC LMH-2**

| Остатки | Химические сдвиги, δ , м.д. | | | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------------|----------------|----------------|------------|
| | C1/H1 | C2/H2 | C3/H3 | C4/H4;H4' | C5/H5;H5' | C6/H6;H6' | OMe |
| α -Araf-(1-5A*) | 108.9/5.14 | 82.3/4.20 | 78.0/4.03 | 85.4/4.08 | 62.8/3.89;3.78 | | |
| α -Araf-(13A*) | 110.0/5.48 | 82.8/4.26 | 78.0/4.00 | 85.4/4.14 | 62.8/3.88;3.77 | | |
| 5)- α -Araf-(1 | 110.6/5.32 | 82.8/4.28 | 78.0/4.08 | 84.7/4.32 | 68.2/3.94;3.86 | | |
| β -Galp-(1 | 104.8/4.55 | 72.0/3.63 | 73.9/3.76 | 69.8/4.16 | 76.6/3.77 | 62.0/3.83 | |
| 3)- β -Galp-(1 | 105.2/4.71 | 71.8/3.85 | 83.2/3.93 | 69.8/4.27 | 76.6/3.77 | 62.5/3.85 | |
| 4)- β -Galp-(1 | 105.2/4.69 | 72.4/3.67 | 73.8/3.72 | 78.1/4.00 | 76.0/3.79 | 62.2/3.88;3.75 | |
| 4)- β -Xylp-2-OMe-(1 | 104.2/4.56 | 83.4/3.33 | 76.4/3.62 | 77.3/3.80 | н.о. | | 61.08/3.55 |
| β -Api-(1 | 110.3/5.12 | 78.0/4.08 | 80.4 | 75.0/4.12; 3.95 | 65.0/3.73;3.73 | | |
| 5)- β -Api-(1 | 110.3/5.12 | 78.0/4.08 | 80.4 | 74.5/4.18;3.92 | 72.3/3.83;3.68 | | |

A* - фрагмент остатков галактуроновой кислоты или апиозы, замещенной в 5-положение.

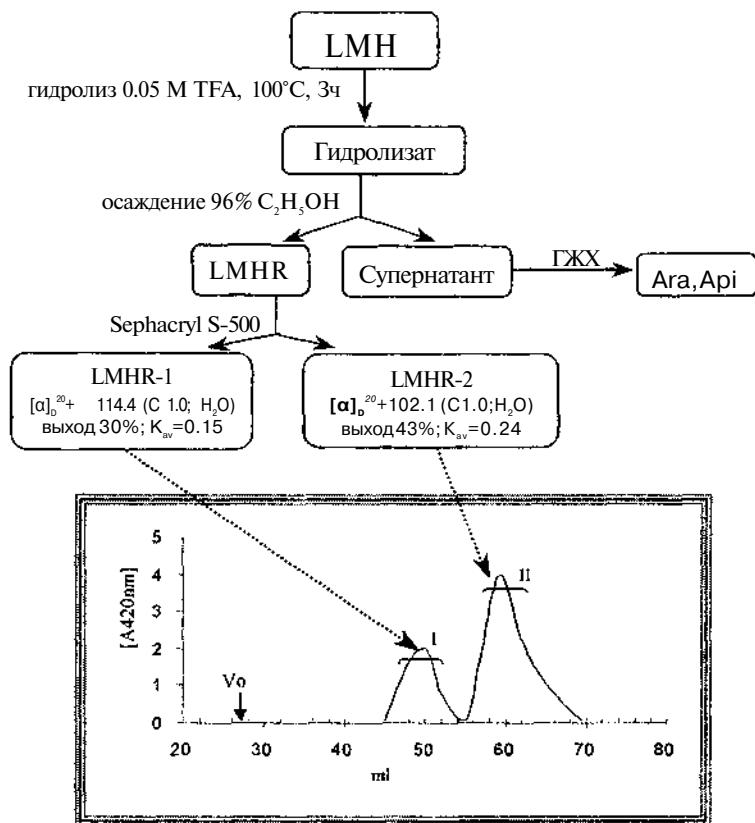


Рис.9. Схема частичного кислотного гидролиза фрагмента LMH.

В гетероядерных корреляционных спектрах $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC фрагмента LMHR-2 присутствуют сигналы метильных групп в области 61.0 м.д. Все сигналы для C-атомов указывают на наличие в данном фрагменте концевой α -ксилопиранозы и 1,4-связанной 2-O-метил-D-ксилопиранозы (рис.10 и табл. 8).

Кроме того, в спектрах HSQC фрагмента LMHR-2 присутствуют сигналы, характерные для терминальной, β -1,3- и β -1,4-связанной галактопиранозы. В гомоядерном спектре ROESY фрагмента LMHR-2 присутствует *транс*-гликозидный корреляционный пик аномерного протона терминальной р-галактопиранозы с третьим протоном β -1,3-связанной галактопиранозы (H1/H3 4.50/3.92) и *транс*-гликозидный корреляционный

**Химические сдвиги сигналов атомов углерода и водорода
в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC/LMHR-2.**

| Остатки | Химические сдвиги, 6, м.д. | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|----------------|------------|
| | C1/H1 | C2/H2 | C3/H3 | C4/H4 | C5/H5;H5 | C6/H6;H6 | OMe |
| 4)- α -GalpA-(1 | 100.7/5.17 | 70.0/3.83 | 70.7/4.05 | 79.6/4.52 | 73.1/4.76 | 176.9 | |
| α -Araf-(1 | 110.4/5.33 | 82.5/4.27 | 78.2/4.08 | 85.5/4.17 | 62.8/3.88;3.77 | | |
| β -Galp-(1 | 104.9/4.50 | 72.3/3.61 | 74.2/3.71 | 70.0/4.18 | 76.6/3.75 | 62.5/3.85 | |
| 3)- β -Galp-(1 | 105.2/4.75 | 71.8/3.85 | 83.2/3.92 | 69.8/4.25 | 76.6/3.75 | 62.5/3.85 | |
| 4)- β -Galp-(1 | 104.2/4.49 | 72.4/3.67 | 73.8/3.73 | 78.1/4.01 | 76.0/3.78 | 62.2/3.93;3.80 | |
| β -Xylp-(1 | 103.1/4.54 | 74.2/3.37 | 76.6/3.61 | 70.5/3.70 | 66.5/4.183.46 | | |
| 4)- β -Xylp-2-OMe-(1 | 104.2/4.55 | 83.4/3.38 | 76.4/3.61 | 77.3/3.81 | 64.5/4.18;3.46 | | 61.08/3.55 |
| 4)- β -Xylp-(1 | 103.3/4.56 | 74.1/3.37 | 75.0/3.63 | 77.9/3.79 | 64.5/4.18;3.46 | | |

На основании этих данных можно говорить о наличии в составе разветвленной области макромолекулы лемнана следующего фрагмента:

β -Galp-(1 3)- β -Galp-(1 4)- β -Galp(1 ...

Спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC фрагмента LMHR-2 содержит также сигналы D-галактопиранозилурановой кислоты, лишенной метоксильных групп, о чем свидетельствует отсутствие резонанса метоксильных групп и сигнала C6-атомов метоксилированных остатков галактуроновой кислоты при 54.1 м.д. и при 172.4 м.д. соответственно (рис.10).

Для детального исследования структуры гетерогликаногалактуронана использовали распад по Смит, представляющий модификацию периодатного окисления. Поскольку нашей целью было исследование гетерогликаногалактуронана, то деградации подвергали фрагмент LMН, в котором боковые цепи апиогалактуронана были уже частично гидролизваны. В результате получили фрагмент LMHS с выходом 36.8% от массы лемнана (табл.2). При действии периодата происходит окисление и последующая деградация фрагмента LMН, в то время как сохраняются 1,3-связанные моносахаридные остатки и моносахаридные остатки, являющиеся точками разветвления углеводных цепей. Следовательно, увеличение количества таких моносахаридов, как арабиноза, галактоза, ксилоза, указывает на возможное наличие разветвлений в боковых цепях, состоящих из данных моносахаридных остатков. Сохранение остатков галактуроновой кислоты (~30%) во фрагменте LMHS позволяет сделать предположение о том, что они являются точками разветвления. Кроме того, возможно, что некоторые остатки галактуроновой кислоты не подвергаются периодатному окислению в связи со стереохимическими особенностями молекулы лемнана.

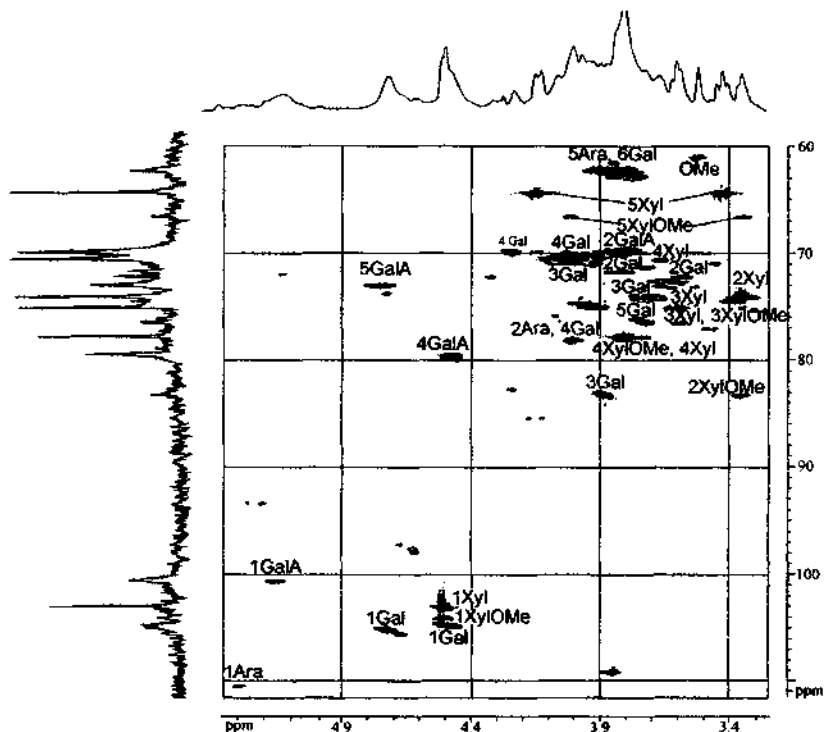


Рис. 10. Гетероядерный спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC фрагмента LMHR-2.

Результаты структурного изучения фрагмента LMHS методом метилирования полностью подтвердили и дополнили уже имеющиеся сведения относительно структуры лемнана (табл.9). Обнаружено, что точками разветвления боковых цепей LMHS и разветвленной области макромолекулы лемнана являются 2,5-ди-О-замещенные остатки L-арабинофуранозы или, возможно, 2,4-ди-О-замещенной D-ксилопиранозы и 3,4-ди-О-замещенные остатки D-галактопиранозы и/или 3,4-ди-О-замещенные остатки D-галактуроновой кислоты (метилирование LMHS проводили после предварительного восстановления боргидридом лития в тетрагидрофуране остатков галактуроновой кислоты).

К сожалению, нам не удалось получить достоверной информации о структурном значении в макромолекуле лемнана остатков L-рамнопиранозы и об их локализации, поскольку число этих остатков в лемнана невелико и их не удалось проанализировать с помощью спектроскопии ЯМР. Не были выделены и фрагменты макромолекулы, содержащие этот моносахаридный

Анализ метилированного олигосахаридного фрагмента LMHS

| Метилированные сахара* | Отн. % по полному ионному току | Тип связи |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 2,3,5-Me ₃ -Araf | 24.1 | Araf-(1 |
| 2,5-Me ₂ -Araf | 2.7 | 3)-Araf-(1 |
| 2,3-Me ₂ -Pent | 48.8 | 5)-Araf-(1 или/и 4)-Xylp-(1 |
| 3-Me-Pent | 5.2 | 2,5)-Araf-(1 или/и 2,4)-Xylp-(1 |
| 2,3,4-Me ₃ -Xylp | 5.6 | Xylp-(1 |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Galp | 9.6 | Galp-(1 |
| 2,3,6-Me ₃ -Galp | 9.4 | 4)-Galp-(1 |
| 2,3,4-Me ₃ -Galp | 5.6 | 6)-Galp-(1 |
| 2,4,6-Me ₃ -Galp | 32.4 | 3)-Galp-(1 |
| 2,6-Me ₂ -Galp | 3.4 | 3,4)-Galp-(1 |

*- данные хромато-масс-спектрометрии

остаток в своем составе. По аналогии с другими пектиновыми полисахаридами можно предположить, что эти остатки локализуются в точках присоединения некоторых боковых цепей гетерогликаногалактуронана к главной углеводной цепи лемнана.

На основании полученных и вышеприведенных данных можно заключить, что, подобно многим пектиновым полисахаридам растений, макромолекула лемнана состоит из линейной и разветвленной областей:

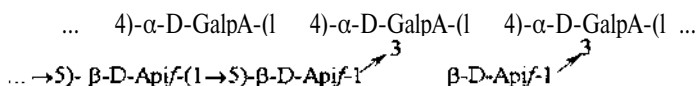
Линейная область и главная углеводная цепь разветвленных областей:

галактуронан:



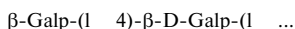
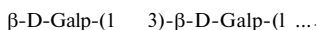
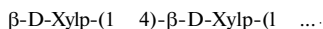
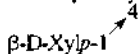
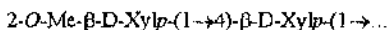
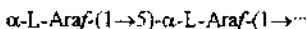
Разветвленные области:

апиогалактуронан:



гетерогликаногалактуронан:

боковые цепи:



точки разветвления:

3,4-ди-О-замещенная D-Galp;

2,4-ди-О-замещенная D-Xylp,

2,5-ди-О-замещенная L-Araf

Выводы

1. Из рязки малой *Lemnaminor* L. выделен пектиновый полисахаридлемнан и впервые показано, что в его состав, наряду с остатками D-галактопиранозилуруновой кислоты и D-апиофуранозы в качестве основных составляющих углеводной цепи, входят остатки D-галактопиранозы, L-арабинофуранозы, L-рамнопиранозы, D-ксилопиранозы и 2-О-метил-D-ксилопиранозы.
2. Установлено, что макромолекула лемнана имеет блочный характер и содержит линейный α -1,4-D-галактуронан в качестве главной углеводной цепи (юра) одновременно линейной области и разветвленных участков апиогалактуронана и гетерогликаногалактуронана.
3. Показано наличие в апиогалактуронане ковалентной связи между главной и боковыми углеводными цепями, которые присоединены в третье положение остатков D-галактуроновой кислоты кора и представляют собой линейные цепи, состоящие из одиночных и β -1,5-связанных остатков D-апиофуранозы.
4. Найдено, что боковые цепи гетерогликаногалактуронана, минорного компонента лемнана, состоят из остатков α -1,3-, α -1,5-связанной L-арабинофуранозы, β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-связанной D-галактопиранозы и β -1,4-связанной D-ксилопиранозы. Точками их разветвления являются остатки 2,5-ди-О-замещенной L-арабинофуранозы и 3,4-ди-О-замещенной D-галактопиранозы.
5. Получены данные по спектроскопии ЯМР апиогалактуронана, различных фрагментов гетерогликаногалактуронана, апиозы и апиобиозы, которые дополняют существующую базу данных и расширяют возможности использования спектроскопии ЯМР для изучения пектиновых полисахаридов.

Основное содержание диссертации изложено
в следующих публикациях:

1. Оводова Р.Г., Бушнева О.А., Головченко В.В., Попов С.В., Оводов Ю.С. Способ получения из растительного сырья полисахаридов, обладающих иммуностимулирующим действием // Патент РФ №2149642 от 27.05. 00. (приоритет от 9.08.99.), БИ № 15, 2000.
2. Оводова Р.Г., Головченко В.В., Шашков А.С., Попов С.В., Оводов Ю.С. Структурное исследование и физиологическая активность лемнана, пектина из *Lemna minor* // Биоорган, химия. - 2000. - Т. 26. - С. 743-751.
3. Оводова Р.Г., Полле А.Я., Головченко В.В., Мельникова Т.И., Мельникова Л.Ф., Бурякина А.В. О результатах фармакологического изучения полисахаридов, выделенных из ряски и пажитки // V Международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения". - 2001. - С. 260-263.
4. **Golovchenko V.V.**, Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Yu.S. Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L. // Phytochemistry. - 2002. - V. 60. - P. 89-97.
5. Оводов Ю.С., **Головченко В.В.**, Оводова Р.Г. Способ получения D-апиозы из полисахарида ряски малой *Lemna minor* L. Патент РФ № 2190666 от 10.10. 02. (приоритет от 11.07.00.), БИ № 28, 2002.
6. **Головченко В.В.**, Оводова Р.Г., Шашков А.С. Структурное исследование лемнана, пектина из *Lemna minor* // Всероссийская конференция "Химия и технология растительных веществ" Тез. докл. Сыктывкар, 2000. - С. 45.
7. Ovodova R.G., **Golovchenko V.V.**, Shashkov A.S., Ovodov Yu.S. Structural studies on lemnan as pectin from *Lemna minor* // Abstracts of 20th International Carbohydrate Symposium. Hamburg, 2000. P.D.A - 129.
8. Popov S., Popova G., **Golovchenko V.**, Ovodova R. Activation of macrophages adherent with complement or scavenger receptor by plant acidic arabinogalactans and neutral galactomannans // Abstracts of 5th John Humphrey Advanced Summer Programme and Lecture Series in Immunology. Pushchino, 2000. - P.76.
9. **Golovchenko V.V.**, Bushneva O.A., Polle A.Ya., Shashkov A.S., Ovodova R.G., Ovodov Yu.S. Structural studies on pectic polysaccharides from *Lemna minor* L., *Silene vulgaris* (*Oberna behen* L.), and *Tanacetum vulgare* L. // Abstracts of 11th European Carbohydrate Symposium. Lisboa, 2001. - P. 312.

10. Bushneva O.A., **Golovchenko V.V.**, Mikhailova N.A., Korneeva E.V., Jumel C, Harding S.E., Pavlov G.M., Ovodova R.G. Extractions and molecular studies of polysaccharides from some plants of the European North of Russia // 11th European Carbohydrate Symposium "Eurocarb XI": Book of Abstracts. - Lisboa, 2001. - P. 316.
11. Popov S.V., **Colovchenko V.V.**, Ovodova R.G., Ovodov Yu.S Influence of monosaccharides on stimulating effect of plant polysaccharides on macrophages // Abstracts of 11th European Carbohydrate Symposium. Lisboa, 2001.-P. 394.
12. **ГОЛОВЧЕНКО В.В.**, Оводова Р.Г. Структурно-химическая характеристика пектинового полисахарида из ряски малой *Lemna minor* L. // II Всероссийская конференция: "Химия и технология растительных веществ": Тез. докл. - Казань, 2002. - С. 96.
13. **Golovchenko V.V.**, Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Yu.S. Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L. // 7th European Training Course on Carbohydrates. Programme and Abstracts. Wageningen, 2002. - P. 32.